Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 4, Oct- Nov 2021, p. 647-657

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۰، ص. ۶۵۷-۶۴۷

مقاله پژوهشی

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی باکتری اسید لاکتیک غالب جدا شده از خمیرترش کینوا

الهام روحی[۱]- علیرضا صادقی[۲]*- سید مهدی جعفری[۳]- محمد عبدالحسینی[۴]- الهام اسدپور[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۱

چکیده

مطالعه ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از بستره‌های تخمیری که فلور میکروبی آن‌ها کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است جهت دستیابی به کشت‌های میکروبی پروبیوتیک و محافظت‌کننده از اهمیت به‌سزایی در صنایع تخمیری برخوردار است. در پژوهش حاضر، باکتری اسید لاکتیک غالب پس از تکرار فرایند مایه‌گیری از خمیرترش کینوا، جداسازی و سپس با توالی‌یابی محصولات PCR حاصل از تکثیر توالی هدف مشخص از ژن *16S rDNA* آن شناسایی شد. در ادامه، قابلیت‌های پروبیوتیکی جدایه لاکتیکی، شامل مقاومت به اسید و صفرا، اثر ضدباکتریایی، ویژگی‌های خود و دگر اتصالی، حساسیت آنتی‌بیوتیکی و همولیز خون مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، اثر بازدارنده جدایه لاکتیکی بر رشد *Aspergillus niger* نیز به روش کشت دو لایه بررسی شد. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی *Enterococcus hirae* به‌عنوان جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش کینوا گردید. همچنین این جدایه لاکتیکی پس از تیمار متوالی اسید و صفرا از زنده‌مانی مناسبی برخوردار بود. علاوه بر این، جدایه لاکتیکی بر *Bacillus cereus* نسبت به سایر عوامل باکتریایی غذازاد اثر بازدارنده بیشتری داشت و تأثیر بازدارندگی روماند خام جدایه لاکتیکی بر عوامل بیماری‌زا به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) از تأثیر روماند خنثی شده آن بیشتر بود. *E. hirae* دارای قابلیت خود اتصالی معادل ۵۴/۷۱ درصد، فاقد قابلیت همولیز و دارای الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مناسبی بود. اثر ضدقارچی این جدایه لاکتیکی بر روی *A. niger* نیز مورد تایید قرار گرفت. با توجه به نتایج این پژوهش، جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش کینوا از قابلیت مناسبی برای استفاده به عنوان کشت پروبیوتیک، محافظت کننده و یا همراه در صنایع تخمیری برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: خمیرترش کینوا، جدایه لاکتیکی غالب، فرایند مایه‌گیری، پروبیوتیک، کشت محافظت کننده.

مقدمه

ارزیابی ویژگی‌های باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از بستره‌های تخمیری با هدف تأمین کشت میکروبی در صنایع تخمیری از اهمیت بسزایی برخوردار است. باکتری‌های اسید لاکتیک، گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و غیراسپورساز هستند که متابولیت‌هایی نظیر اسید استیک، اتانول، باکتریوسین، ترکیبات معطر و اگزوپلی‌ساکارید تولید کرده و محصول نهایی تخمیر آن‌ها اسید لاکتیک است. این باکتری‌ها که در طی قرن‌ها در تولید مواد غذایی و نوشیدنی‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند، توسط سازمان غذا و داروی آمریکا، ایمن[۶] (GRAS) شناخته شده‌اند. این باکتری‌ها همچنین به‌عنوان ساکنان طبیعی دستگاه گوارش انسان، نقش بسیار مهمی در بقای جمعیت میکروبی روده ایفا کرده و اثرات سودمندی در انسان به جای می‌گذارند که از قابلیت‌هایی همچون جلوگیری از تهاجم باکتری‌های بیماری‌زا و بهبود عملکرد حامل‌های مخاطی[۷] ناشی می‌شود. اصطلاح پروبیوتیک به معنی "برای زندگی" نیز به میکروارگانیسم‌هایی اطلاق می‌شود که با جمعیت مشخص پس از زنده‌مانی در دستگاه گوارش در سلامت انسان مؤثر باشند. برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک جزء پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شوند. این باکتری‌ها به محیط اسیدی معده، بسیار مقاوم بوده و با عبور از روده و قرار گرفتن در معرض مخاط آن، حتی سه روز پس از مصرف قادر به زنده‌مانی و استقرار در آن می‌باشند. این امر، موجب افزایش مقاومت بدن، سلامت سیستم گوارش و همچنین مهار برخی از باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود (Saxelin *et al*, 2005).

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، گروه زیست فناوری مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۴-استادیار، گروه مهندسی آب، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۵-استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه غیر انتفاعی بهاران، گرگان، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: Sadeghi.gau@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v17i4.83240

6 Generally Recognized As Safe
7 Epithelial barrier

کینوا[1] به‌عنوان یک شبه غله، دارای مقادیر قابل توجهی پروتئین، ویتامین و مواد معدنی بوده، همچنین غنی از فیبر، کلسیم، امگا۳، آهن، لیزین، منگنز و فسفر است. این شبه غله، حاوی مقادیر قابل توجهی از پلی‌فنول‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و فیتوسترول نیز می‌باشد (Axel *et al*, 2015). تاکنون، مطالعاتی در خصوص شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شبه غلات تخمیر شده و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی آن‌ها گزارش شده است. به‌عنوان مثال، Manini و همکاران (۲۰۱۶)، با بررسی چندین باکتری اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش سبوس گندم دریافتند که این باکتری‌ها دارای خواص پروبیوتیکی شامل تحمل اسید و صفرا، قابلیت اتصال به سلول‌های مخاطی و فعالیت ضدلیستریایی بودند و از خود خاصیت ضدقارچی نیز نشان دادند. طبق گزارش Oliveira و همکاران (۲۰۱۵)، باکتری‌های *Lactobacillus amylovorus* و *Lactobacillus reuteri* در برابر قارچ *Fusarium culmorum* به مدت ۷ روز اثر بازدارندگی داشتند. همچنین Axel و همکاران (۲۰۱۵)، بیان کردند که ممانعت از توسعه قارچ و زمان ماندگاری نان خمیرترشی حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک در مقایسه با نمونه کنترل، افزایش قابل توجهی داشت به طوری که زمان ماندگاری نان خمیرترشی ۲۵ درصد افزایش یافت.

علاوه بر این، گزارش شده است که *Lactobacillus rossiae* و *Lactobacillus plantarum* در اثر تولید اسیدهای آلی به خصوص اسید فرمیک در برابر قارچ‌های نانوایی نظیر *Penicillium roqueforti* از خود مقاومت نشان دادند (Rizzello *et al*, 2016). Demirbaş و همکاران (۲۰۱۷)، نیز از یک نمونه خمیرترش، ۱۵ سویه باکتری اسید لاکتیک جداسازی کرده و اثر آن‌ها را بر عوامل بیماری‌زای غذازاد نظیر *Salmonella typhimurium* و قارچهایی چون *Penicillium chrysogenum* و *Asprgillus niger* بررسی کردند. Matejčeková و همکاران (۲۰۱۷) نیز *Lactobacillus rhamnosus* را از باکویت[2] تخمیر شده جداسازی نموده و آن را به عنوان یکی از پروبیوتیک‌های دارای قابلیت جایگزینی در دستگاه گوارش معرفی کردند. همچنین Kunchala و همکاران (۲۰۱۶) بر اساس ویژگی‌هایی چون زنده‌مانی در اسید و صفرا، مقاومت به آنتی‌بیوتیک، فعالیت ضدباکتریایی و تعادل فنولی، چند باکتری پروبیوتیک شامل *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus* و *Bacillus pumilus* را از خمیر سورگوم و ارزن مرواریدی جداسازی و شناسایی کردند. Sadeghi و همکاران (۲۰۱۹) نیز ضمن بررسی قابلیت‌های پروبیوتیکی جدایه لاکتیکی منتخب خمیرترش سبوس برنج، تاثیر جالب توجه آن بر کاهش آفلاتوکسین‌ها را گزارش نمودند. این محققین همچنین عدم تاثیر جدایه منتخب بر سلول‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موش تغذیه شده با آن را به‌عنوان مهم‌ترین معیارهای بررسی ایمنی پروبیوتیک‌ها در موجود زنده[3] تایید کردند.

تاکنون مطالعات اندکی در خصوص بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش کینوا صورت گرفته است. از این‌رو، پژوهش حاضر به‌منظور ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش کینوا انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ابتدا آرد کینوا، الک (مش ۴۵) گردیده و ویژگی‌های آرد تولیدی نیز بر اساس روش‌های مدون (AOAC, 2005) تعیین شد. محیط‌های کشت میکروبی از شرکت Merck آلمان تهیه شدند و سویه‌های میکروبی مورد استفاده شامل *Esherichia coli* (PTCC 1399)، *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112)، *Salmonella enterica* (PTCC 1709)، *Bacillus cereus* (PTCC 1015) و *Aspergillus niger* (PTCC 5012) نیز از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران، خریداری و سپس در محیط‌های کشت مناسب، فعال‌سازی گردیدند.

تخمیر تصادفی کینوا

برای تخمیر تصادفی کینوا از مخلوط آرد کینوا و آب با بازده خمیر (نسبت خمیر به آرد× ۱۰۰) معادل ۲۰۰ استفاده شد. مخلوط مذکور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تخمیر گردید (Axel *et al*, 2016)، و برای تعیین اسیدیته قابل تیتر خمیرترش کینوا، ۱۰ گرم خمیرترش و ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر با NaOH ۰/۱ مولار تا رسیدن به pH معادل ۸/۵ تیتر شد و سپس اسیدیته برحسب میلی‌لیتر NaOH مصرفی گزارش گردید.

جداسازی و شناسایی باکتری اسید لاکتیک غالب

جهت جداسازی فلور لاکتیکی غالب خمیرترش کینوا پس از تکرار فرآیند مایه‌گیری (افزودن ۲۵ درصد از خمیرترش روز قبل به خمیرترش تولیدی) از کشت سطحی خمیرترش پس از رسیدن pH آن به حدود ۴ استفاده شد. در ادامه برای رسیدن به تک پرگنه خالص جدایه‌های لاکتیکی از آن‌ها کشت خطی تهیه گردید. سپس تک پرگنه خالص به‌دست آمده توسط آزمون‌های کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم، بررسی و DNA آن‌ها استخراج گردید (کیت استخراج DNA، بیونیر آکیوپرپ K-3032، کره جنوبی). سپس DNA استخراج شده توسط PCR با پرایمرهای یونیورسال F44 و R1543 تکثیر و متعاقباً محصولات PCR

1 *Chenopodium quinoa* Willd
2 Buckwheat
3 *In vivo* safety

پس از ژل الکتروفورز (ولتاژ ۹۰، به مدت ۲۵ دقیقه در آگارز ۱/۵ درصد)، توالی‌یابی شدند (بیونیر، کره جنوبی). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنشگرهای آماده مصرف PCR (آمپلیکون، دانمارک)، ۱/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۵ میکرومولار، ۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم و ۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام گردید. در مرحله اول تکثیر، واسرشت DNA با شروع داغ در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، آغاز و طی ۳۵ چرخه با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه ادامه یافت. در پایان، مرحله تکثیر انتهایی نیز به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (ترموسایکلر کوربت CG1-96، استرالیا) خاتمه یافت. در ادامه به‌منظور شناسایی جدایه لاکتیکی، محصولات PCR پس از توالی‌یابی با استفاده از رویه Blast[1] با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI[2] هم‌ردیف شدند (Abnous *et al*, 2009).

مقاومت جدایه لاکتیکی به تیمار متوالی اسید و صفرا

بدین منظور، ابتدا سوسپانسیون حاوی جدایه لاکتیکی (کشت فعال ۲۴ ساعته) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ (هانیل کومبای‌R 514، کره جنوبی) گردید. سپس با حذف فاز بالایی، رسوب باقیمانده در محلول بافر فسفات استریل با جذبی معادل ۰/۵ مک فارلند (اسپکتروفتومتر PG اینسترومنتز، انگلستان) حل شد. در ادامه با استفاده از اسید کلریدریک یک نرمال، pH سوسپانسیون مذکور به معادل ۲ رسانده شد و به مدت ۱/۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. در مرحله بعد pH این سوسپانسیون با سود یک نرمال به حدود ۶ تنظیم گردید و ۰/۳ درصد وزنی/ حجمی نمک صفراوی نیز به آن افزوده شد. سپس گرمخانه‌گذاری مجدد سوسپانسیون به مدت ۱/۵ ساعت انجام گرفت و در انتها جمعیت جدایه لاکتیکی با رقت‌سازی متوالی در بافر فسفات استریل و کشت سطحی بر MRS آگار در مقایسه با نمونه شاهد (تیمار نشده) تعیین گردید (Zhang *et al*, 2011).

اثر ضدباکتریایی جدایه لاکتیکی

جهت ارزیابی خواص ضدباکتریایی جدایه لاکتیکی در برابر *E. coli*، *S. aureus*، *S. enterica* و *B. cereus* از روش انتشار در دیسک استفاده شد. ابتدا جدایه لاکتیکی در محیط کشت MRS براث و باکتری‌های غذازاد مذکور در محیط کشت BHI براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس جمعیت جدایه لاکتیکی و عوامل باکتریایی با روش جذب‌خوانی به معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تنظیم گردید. در مرحله بعد، دیسک‌های کاغذی استریل (پادتن طب، ایران) با فاصله معین از لبه پلیت در سطح محیط کشت حاوی باکتری‌های غذازاد قرار داده شد و سپس ۴۰ میکرولیتر از بافر فسفات حاوی جدایه لاکتیکی با جمعیت معادل ۰/۵ مک‌فارلند بر دیسک‌های کاغذی ریخته شد. نهایتاً پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و قطر هاله عدم رشد نیز با نرم‌افزار Image J (نسخه 1.42e) اندازه‌گیری گردید (Reller *et al*, 2009).

اثر ضدباکتریایی روماند فاقد سلول[3] جدایه لاکتیکی

برای ارزیابی اثر روماند فاقد سلول جدایه لاکتیکی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انتخابی (که بیشترین اثر بازدارنده جدایه لاکتیکی در مرحله قبل در برابر آن‌ها مشاهده شده بود) از روش ریز رقت (میکرودایلوشن براث) استفاده شد. بدین منظور، جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا مورد استفاده به 10^8 CFU/mL رسانیده شد و سپس اثر روماند فاقد سلول خام و خنثی شده بر آن‌ها بررسی گردید. جهت تهیه روماند فاقد سلول خام، کشت ۲۴ ساعته جدایه لاکتیکی با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی به‌دست آمده از فیلتر سرنگی (جت بیوفیل، چین) ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شد. همچنین برای تهیه روماند فاقد سلول خنثی شده، pH روماند فاقد سلول خام تهیه شده با سود یک نرمال تا pH=۶/۵ خنثی گردید. نمونه کنترل منفی در این آزمون، شامل مخلوط ۱۸۵ میکرولیتر روماند فاقد سلول خام و ۱۵ میکرولیتر از هر یک از عوامل باکتریایی اتوکلاو شده و نمونه کنترل مثبت نیز شامل مخلوط ۱۸۵ میکرولیتر محیط کشت و ۱۵ میکرولیتر باکتری بیماری‌زا بودند. همچنین در چاهک مربوط به روماند فاقد سلول خام و خنثی شده، مقدار ۱۸۵ میکرولیتر از هر روماند و ۱۵ میکرولیتر از باکتری بیماری‌زای مورد نظر اضافه شد. سرانجام این میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و سپس توسط دستگاه خوانشگر میکروپلیت (سکو MPR01، آلمان) در طول موج ۶۲۰ نانومتر جذب‌سنجی صورت گرفت (Campana et al, 2017).

قابلیت خوداتصالی و دگراتصالی

در ارزیابی خاصیت دگراتصالی جدایه لاکتیکی با *E. coli* به‌عنوان یک عامل عفونی روده، سوسپانسیونی هم حجم با جمعیت مشابه متشکل از جدایه لاکتیکی و باکتری بیماری‌زا به صورت منفرد و همچنین مخلوط آن‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۴ ساعت

1 Basic local alignment search tool
2 National center for biotechnology information
3 (CFS) Cell free supernatant

گرمخانه‌گذاری شدند. سپس جذب این سوسپانسیون‌ها در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از طریق معادله $100\times [2/ (AP+Alac)/2-(Amix)/AP+Alac)]$، میزان خاصیت دگراتصالی محاسبه گردید. در این رابطه A_P: جذب سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا، A_{lac}: جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و A_{mix}: جذب مخلوط سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و باکتری بیماری‌زا پس از ۴ ساعت گرمخانه‌گذاری است. همچنین برای ارزیابی قابلیت خود اتصالی جدایه لاکتیکی، چهار میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید و جذب نوری سوسپانسیون در زمان‌های متفاوت (صفر و ۲۴ ساعت) در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و در نهایت، میزان قابلیت خود اتصالی بر اساس رابطه $[1-(A_t/A_0)]\times 100$ محاسبه گشت. در این رابطه A_t مقدار جذب پس از ۲۴ ساعت و A_0 مقدار جذب در ساعت صفر است (Collado *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2011).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری اسید لاکتیک به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت MRS آگار یک درصد (نیمه جامد) اضافه شد. سپس مخلوط مذکور بر سطح پلیت‌های حاوی ۴ میلی‌لیتر MRS آگار ۱/۵ درصد ریخته شد. در ادامه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل آمپی‌سیلین، جنتامایسین، استرپتومایسین، سفازولین، سیپروفلوکساسین، پنی‌سیلین، سفالوتین، ایمیپنم، نووبیوسین، کلیندامایسین، ونکومایسین، سفتریاکسون و نالیدیکسیک اسید (پادتن طب، ایران) بر روی سطح هر پلیت قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شده و به صورت مقاوم (قطر کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر)، حساسیت نسبی (قطر ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر) و حساس (قطر بیش از ۲۰ میلی‌متر) گزارش گردید (Rojo-Bezares *et al*, 2006).

قابلیت همولیز خون

بدین منظور، جدایه لاکتیکی بر سطح محیط کشت Blood آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند، کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ایجاد هاله و تغییر رنگ در محیط کشت بررسی گردید (Angmo *et al*, 2016).

اثر ضدقارچی

برای ارزیابی اثر ضدقارچی جدایه لاکتیکی در برابر *A. niger* از روش کشت دو لایه استفاده شد. در این روش از کشت فعال جدایه لاکتیکی در مرکز پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS آگار، خطوط سه سانتی‌متری با فاصله متناسب از یکدیگر کشیده و به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس از مخلوط سوسپانسیون اسپور قارچ مذکور با جمعیت ۱۰^۴ spore/mL به‌صورت کشت دو لایه، با محیط کشت YGCآگار بر روی خطوط کشت داده شده ریخته و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و در نهایت، قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف خطوط کشت داده شده جدایه لاکتیکی، تعیین گردید (Magnusson *et al*, 2003).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از طرح کاملاً تصادفی به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و داده‌ها با نرم افزار (نسخه ۱۶) SPSSمورد آنالیز قرار گرفته و برای ترسیم نمودارها نیز ازMicrosoft Office Excel 2016 استفاده گردید. برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD[1]) در سطح $P<0/05$ استفاده شد.

نتایج و بحث

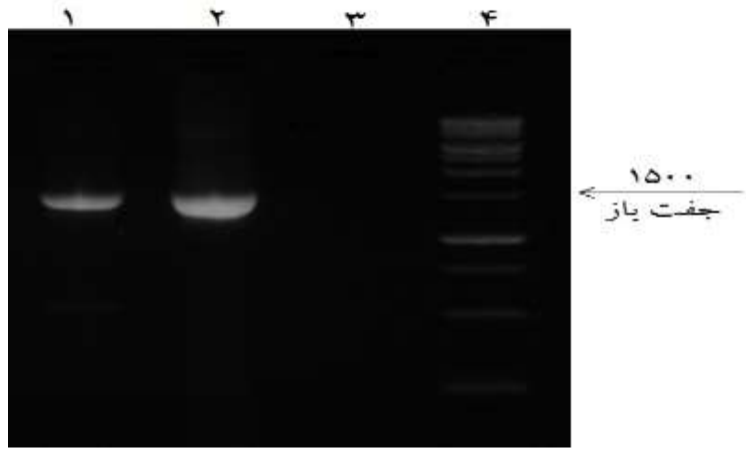
شناسایی باکتری اسید لاکتیک غالب

در این پژوهش، آرد کینوا دارای ۴/۶ درصد چربی، ۱۲/۷ درصد پروتئین، ۱/۸ درصد خاکستر، ۱۱/۵ درصد رطوبت و ۶۹/۴ درصد کربوهیدرات بود. همچنین پس از چهار مرتبه تکرار فرآیند مایه‌گیری، pH خمیرترش کینوا به حدود ۴ رسید و باکتری اسید لاکتیک غالب به روشی که قبلا توضیح داده شد جدا گردید. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژی، جدایه لاکتیکی غالب، یک باکتری گرم مثبت، کاتالاز منفی و کروی شکل بود. ژل الکتروفورز محصولات PCR نیز منجر به تایید اولیه تکثیر اختصاصی توالی هدف ۱۵۰۰ جفت بازی در DNA ژنومی جدایه لاکتیکی در مقایسه با نمونه کنترل منفی (فاقد DNA) و کنترل مثبت (DNA استخراج شده از سویه کلکسیونی) شد (شکل ۱). سرانجام بر اساس نتایج توالی‌یابی محصولات PCR و همردیفی آن‌ها با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI، *Enterococcus hirae* (۹۸ درصد تشابه با شماره دسترسی NR_075022.1) به‌عنوان جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش کینوا شناسایی گردید.

Rizzelloو همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی از خمیرترش کینوا سویه‌های *Pediococcus pentosaceus* و *L. plantarum* را جدا کردند. همچنین Ogunsakin و همکاران (۲۰۱۷) از خمیرترش

1 The least significant difference

سورگوم، دو سویه *P. pentosaceus* و یک سویه *Weissella confusa* را شناسایی و جداسازی کردند. تنوع میکروارگانیسم‌های موجود در انواع غلات و شبه غلات تخمیر شده به عوامل مختلفی از جمله شرایط تخمیر (دما، زمان، pH)، تعداد دفعات مایه‌گیری، زمان تکرار فرایند مایه‌گیری، اندازه ذرات آرد، نسبت آب به آرد و ماهیت غلات (واریته، محتوای خاکستر و پروتئین) بستگی دارد. لذا همواره احتمال مواجهه با فلور میکروبی متفاوت در انواع تخمیر شده این بستره‌ها وجود دارد.



شکل ۱- نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR. لاین۱: کنترل مثبت، لاین۲: جدایه لاکتیکی، لاین۳: کنترل منفی و لاین٤: لدر یک کیلو جفت بازی.

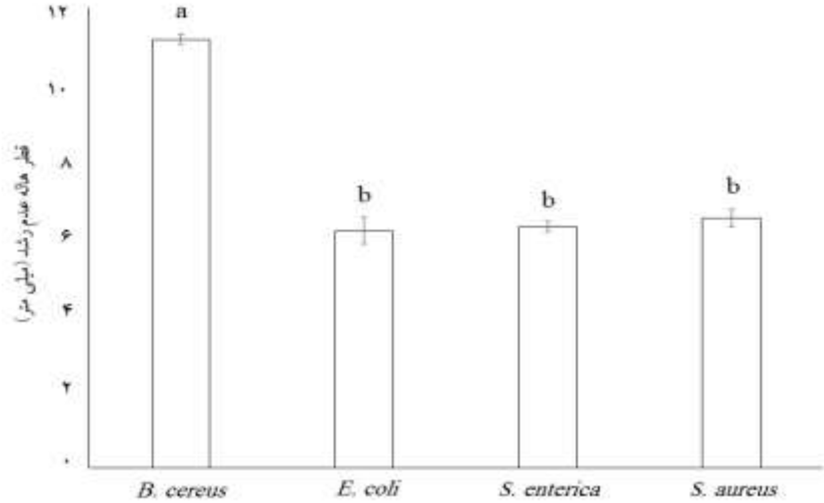
مقاومت به اسید و صفرا

زنده‌مانی جدایه لاکتیکی پس از تیمار متوالی اسید و صفرا از ۸ log CFU/mL به ۶ log CFU/mL در مقایسه با نمونه کنترل رسید. Manini و همکاران (۲۰۱۶) طی پژوهشی دریافتند که *Lactobacillus brevis*، *Leuconostoc mesenteroides* و *P. pentosaceus* قادر به زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش بودند. همچنین طبق مطالعه Han و همکاران (۲۰۱۷) عنوان گردید که *L. brevis*، *Lactobacillus curvatus* و *P. pentosaceus* به‌ترتیب، بیشترین مقاومت به صفرا و کوتاه‌ترین فاز تاخیری رشد را داشتند. Shahrestani و همکاران (۲۰۱۹) نیز طی پژوهشی گزارش کردند که از بین ۲۸ باکتری اسید لاکتیک، ۵ سویه پروبیوتیک مقاوم به اسید و صفرا شناسایی شدند. زنده‌مانی به اسید و صفرا جزء ویژگی‌های اصلی مورد نیاز باکتری‌های پروبیوتیک جهت زنده‌مانی و رشد در معده و روده کوچک می‌باشد. غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی نیز غلظت بحرانی بوده و برای غربالگری گونه‌های مقاوم مناسب است (Ruiz Rodríguez *et al*, 2016). بر اساس مطالعات صورت گرفته، صفرا حتی در غلظت‌های پایین هم می‌تواند با تأثیر بر دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها موجب مهار رشد آن‌ها شود. عموماً با تجمع صفرا در سیتوپلاسم باکتری‌ها، تجمع پروتون نیز افزایش می‌یابد و زنده‌مانی برخی از میکروارگانیسم‌ها به قابلیت آنزیم ATPase غشاء که وظیفه انتقال پروتون از سیتوپلاسم به محیط خارج سلولی را دارد نسبت داده می‌شود. همچنین اکثر باکتری‌ها قادر به تحمل شرایط اسیدی نبوده و شرایط مذکور بیشترین آسیب را به آن‌ها می‌زند (Delgado *et al*, 2007). مقاومت باکتری‌های اسید لاکتیک به اسید به الگوی تحمل pH آن‌ها (که خود بر فعالیت آنزیم مذکور مؤثر است) و همچنین عوامل خارجی نظیر محیط کشت و شرایط گرمخانه‌گذاری بستگی دارد. علاوه بر این، ماتریکس و محتوای تغذیه‌ای ماده غذایی نیز می‌تواند برای باکتری‌ها در برابر مخاط روده و معده، نقش محافظتی ایفا کند. لذا اجزای آرد کینوا (پروتئین، لیپید و فیبر) بر تحمل شرایط دستگاه گوارش در پروبیوتیک‌ها اثر دارد (Casarotti *et al*, 2014).

اثر ضدباکتریایی جدایه لاکتیکی به روش انتشار در دیسک

همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است اثر بازدارنده جدایه لاکتیکی بر روی *B. cereus* به شکل معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) از سایر عوامل باکتریایی غذازاد مورد مطالعه بیشتر بود. علاوه بر این، قطر هاله عدم رشد *S. aureus* از *E. coli* و *S. enterica* در حضور جدایه لاکتیکی بیشتر بود اما بین اثر ضدباکتریایی جدایه لاکتیکی بر روی این سه عامل باکتریایی غذازاد، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مطالعه Adisa و Ifesan (۲۰۱۶) در خصوص اثر بازدارنده باکتری‌های پروبیوتیک جدا شده از تخمیر خودبه‌خودی شبه غلات در برابر عوامل بیماری‌زا، مشخص شد که این باکتری‌ها اثر باکتریوستاتیک و باکتریوسیدال داشته و بیشترین اثر، مربوط به *L. plantarum* در برابر *S. aureus* بود. همچنین Demirbaş و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که از بین ۱۵ باکتری پروبیوتیک جداشده از خمیرترش،

L. plantarum و *Lactobacillus paralimentarius* *بیشترین* اثر بازدارندگی را بر *S. typhimurium* و *B. cereus* داشتند.



شکل ۲- قطر هاله عدم رشد عوامل باکتریایی غذازاد در حضور جدایه لاکتیکی مورد مطالعه به روش انتشار در دیسک.
حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0/05$ است.

اثر ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک به دلیل تولید ترکیباتی نظیر اتانول، اسید فرمیک، استون، پراکسید هیدروژن، دی استیل، رئوترین، روتروسایکلین و باکتریوسین است. همچنین از آنجا که خاصیت ضدمیکروبی در pH پایین در بالاترین حد خود قرار دارد، حضور اسیدهای آلی خصوصاً اسید استیک و اسید لاکتیک و اثر متقابل آن‌ها با سایر ترکیبات بازدارنده از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (Russo *et al*, 2017). بسته به نوع باکتری اسید لاکتیک، نوع و مقدار متابولیت‌های تولیدی، نوع باکتری بیماری‌زا و جمعیت آن، شرایط گرمخانه‌گذاری و حتی اثر متقابل متابولیت‌های ضدمیکروبی، اثر بازدارنده متفاوت خواهد بود. در اثر ضدمیکروبی جدایه‌های لاکتیکی نیز مکانیسم‌های مختلفی از جمله الگوی فعالیت آنزیم، مهار رشد و تشکیل حفره در غشاء سلولی، مهار جایگاه‌های اتصال و محدود نمودن لانه‌گزینی میکروارگانیسم‌های ناخواسته در روده و همچنین جلوگیری از دسترسی آن‌ها به مواد مغذی مطرح شده است (Oliveira *et al*, 2015).

اثر ضدباکتریایی روماند فاقد سلول جدایه لاکتیکی

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بین خاصیت ضدباکتریایی روماند فاقد سلول خام و روماند فاقد سلول خنثی شده حاصل از کشت *E. hirae* بر روی باکتری‌های غذازاد، تفاوت معنی‌داری در سطح $P<0/05$ مشاهده شد. روماند خام جدایه لاکتیکی، به شکل معنی‌داری تأثیر بازدارنده بیشتری بر کاهش *S. enterica* نسبت به *B. cereus* داشت. علاوه بر این، تأثیر بازدارندگی روماند خنثی شده جدایه لاکتیکی بر *B. cereus* بیشتر بود و هیچ اثر بازدارندگی بر *S. enterica* نشان نداد. همچنین پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، تأثیر بازدارندگی روماند خام جدایه لاکتیکی در مورد هر دو باکتری بیماری‌زا به شکل معنی‌داری از تأثیر روماند خنثی شده بیشتر بود.

Campana و همکاران (۲۰۱۷) روماند فاقد سلول ۷ باکتری اسید لاکتیک را در برابر عوامل بیماری‌زای غذازاد مورد آزمون قرار داده و گزارش کردند که بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به *L. rhamnosus* در برابر *Campylobacter jejuni* بود. انحلال دیواره سلولی و تجزیه سلول از دلایل بروز خاصیت ضدمیکروبی روماند فاقد سلول باکتری‌های اسید لاکتیک عنوان شده است. خنثی نمودن روماند فاقد سلول می‌تواند اثر بازدارندگی باکتری‌های اسیدلاکتیک را کاهش داده و یا از بین ببرد. در چنین مواردی فعالیت ضدمیکروبی روماند فاقد سلول را می‌توان به مشتق‌های اسیدی تولید شده و یا متابولیت‌های بازدارنده‌ای نسبت داد که در pH خنثی، غیرفعال می‌شوند. اگرچه روماند فاقد سلول می‌تواند شامل ترکیبات متعددی باشد، ولی زمانی که فعالیت ضدمیکروبی با خنثی‌سازی کاهش یابد، اهمیت اثر اسیدهای آلی محرز می‌گردد. اسیدهای آلی می‌توانند در pH پایین به شکل تجزیه نشده از طریق غشاء، وارد سلول باکتری‌های بیماری‌زا شده و در درون سلول بسته به pH تجزیه گردند. لذا یون‌های H^+ آزاد شده با اسیدی کردن سیتوپلاسم، موجب از بین رفتن شیب الکتروشیمیایی پروتون‌ها و در نهایت مرگ باکتری‌ها می‌شوند (Axelsson *et al*, 1989). علت اثر ضدمیکروبی روماند فاقد سلول خام جدایه لاکتیکی مذکور بر روی

B. cereus نیز می‌تواند مربوط به اسیدهای آلی و یا سایر متابولیت‌های ضدمیکروبی نظیر باکتریوسین‌ها باشد که در pHهای اسیدی، فعال هستند. در حالی‌که اثر ضدمیکروبی روماند مذکور بر روی *S. enterica* را می‌توان تنها به اسیدهای آلی نسبت داد زیرا با خنثی شدن روماند فاقد سلول، هیچ‌گونه اثر بازدارندگی مشاهده نشد. باکتریوسین‌ها نیز از متابولیت‌های بسیار مهم در خاصیت ضدباکتریایی بوده و می‌توانند با جلوگیری از تشکیل دیواره سلولی و یا ایجاد حفره در آن موجب مرگ عوامل بیماری‌زا شوند. البته اثر این متابولیت‌ها با جذب از طریق اجزای غذا، تغییر حلالیت و یا توزیع غیریکنواخت در ماتریکس غذایی کاهش می‌یابد (Russo *et al*, 2017).

جدول ۱- اثر بازدارنده روماند فاقد سلول جدایه لاکتیکی (درصد کاهش جمعیت)

روماند فاقد سلول جدایه لاکتیکی (CFS)	*Bacillus cereus*	*Salmonella enterica*
روماند خام (Crude CFS)	۶۷/۳۶ ± ۰ ^{bA}	۷۱/۰۹ ± ۰/۱۱ ^{Aa}
روماند خنثی شده (Naturalized CFS)	۱۱/۲۸± ۰/۴۸ ^{aB}	۰ ± ۰^{Bb}

حروف کوچک و بزرگ ناهمسان به ترتیب، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف و ستون در سطح P<۰/۰۵ می‌باشند.

قابلیت خود اتصالی و دگر اتصالی جدایه لاکتیکی

میزان قابلیت خود اتصالی جدایه لاکتیکی معادل ۵۴/۷۱ درصد و میزان قابلیت دگر اتصالی آن با *E. coli* نیز معادل ۱۳/۱۴ درصد بود. Han و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که از میان ده باکتری اسید لاکتیک مورد بررسی، *L. brevis* بیشترین میزان خود اتصالی را از خود نشان داد. به نحوی که میزان خود اتصالی آن پس از ۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به حدود ۲۰ و پس از ۲۴ ساعت به ۸۰ درصد رسید. همچنین Campana و همکاران (۲۰۱۷) بیشترین میزان خود اتصالی را مربوط به *Bifidobacterium bifidum* (۲۱ درصد) و بیشترین میزان دگر اتصالی را در برابر *E. coli* به *L. rhamnosus* (۱۷ درصد) نسبت دادند. خاصیت خوداتصالی باکتری‌های پروبیوتیک از عوامل کلیدی جهت استقرار آن‌ها در دستگاه گوارش و همچنین مهار تکثیر عوامل بیماری‌زا می‌باشد. پروبیوتیک‌ها با اتصال به باکتری‌های هم نوع، موجب ایجاد یک پوشش زیستی بر روی سلول‌های روده‌ای، محافظت از دستگاه گوارش و سیستم ایمنی بدن میزبان و همچنین جلوگیری از ورود عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Han *et al*, 2017). این خاصیت، تحت تأثیر شرایط محیطی و ناشی از تعاملات فیزیکی و شیمیایی پیچیده است. با این حال، عوامل اصلی موثر، شامل خاصیت آبگریزی سطحی سلول و ترکیبات سطح آن می‌باشد (García-Cayuela *et al*, 2014). پدیده دگر اتصالی، فاصله بین سلول‌های پروبیوتیک و عوامل بیماری‌زا را کاهش داده و موجب افزایش کارآیی متابولیت‌های ضدمیکروبی تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها می‌شود. وجود اگزوپلی‌ساکاریدها نیز در بروز این خاصیت، موثر هستند چرا که می‌توانند در تشکیل بیوفیلم به‌عنوان یک عامل اتصالی، جهت ایجاد اثر متقابل بین کربوهیدرات، لکتین و پروتئین عمل کنند (Bernardeau *et al*, 2008). اگرچه عوامل بیماری‌زا به وجود اسیدهای آلی حساس هستند ولی توسط اجزاء ماده غذایی محصور شده و اثر آن‌ها در روده کاهش می‌یابد. از این رو خاصیت دگر اتصالی در مقایسه با اسیدهای آلی در حفاظت از میزبان در برابر عفونت‌ها موثرتر معرفی شده است. علاوه بر این، باکتری‌هایی که دارای این ویژگی هستند نسبت به سایر باکتری‌ها زودتر از روده خارج می‌شوند (Collado *et al*, 2007).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه لاکتیکی

بر اساس نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی که در جدول ۲ نشان داده شده است، جدایه لاکتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و ونکومایسین، مقاوم بوده و نسبت به سفازولین و آمپی‌سیلین دارای حساسیت نسبی و همچنین نسبت به پنی‌سیلین، ایمیپنم و سفالوتین، حساس بود. بر اساس گزارش Rajoka و همکاران (۲۰۱۷) تمام باکتری‌های اسید لاکتیک مورد بررسی به استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، کانامایسین، پنی‌سیلین، سفالوتوکسین و کیپروفلوکسازین، مقاوم و به آموکسی‌سیلین، حساس بودند. همچنین دو سویه نیز به تتراسیکلین و اریترومایسین، حساسیت نشان دادند. بر اساس نتایج Sadeghi و همکاران (۲۰۱۹)، *L. brevis* جدا شده از خمیرترش سبوس برنج به آمپی‌سیلین، نووابیوسین، سفیکسیم، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، کلیندامایسین، سفالکسین، سفتریاکسون و پنی‌سیلین، حساس بوده و در مقابل به ونکومایسین، استرپتومایسین و نالیدیکسیک اسید، مقاوم و به ایمیپنم نیمه حساس بود. مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های اسید لاکتیک به عواملی همچون ماهیت آنتی‌بیوتیک، محل هدف آن و نوع باکتری بستگی دارد و مشتمل بر فرایندهای مهار سنتز دیواره سلولی (مهم‌ترین مکانیسم)، مهار سنتز پروتئین و مهار فرآیند ترجمه (تتراسایکلین بیشتر از این طریق عمل می‌کند)، تغییر غشاء سلولی، مهار سنتز اسید نوکلئیک و فعالیت ضدمتابولیکی است. این مکانیسم‌ها توسط پلاسمیدها و یا ژن‌های محافظت شده غیرقابل انتقال در کروموزوم هر سویه رمزگذاری می‌شوند. همانطور که گفته شد، مکانیسم اصلی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تغییر نفوذپذیری سلول است اما مقاومت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها که مانع از سنتز

پروتئین‌هایی مانند آمینوگلیکوزیدها می‌شود، می‌تواند موجب عدم انتقال الکترون از سیتوکروم و تغییر در نفوذپذیری سلولی گردد. مهم‌ترین علت این مقاومت نیز اصلاح آنزیمی آنتی‌بیوتیک توسط ژن‌های کد کننده پلاسمیدی عنوان شده است (Abriouel *et al*, 2015; Sharma *et al*, 2016). همانطور که عنوان گردید جدایه لاکتیکی در پژوهش حاضر، نسبت به ونکومایسین نیز مقاوم بود. ونکومایسین، نمایانگر سطح گلیکوپپتیدی آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و علیه اغلب باکتری‌های گرم مثبت فعال است. در چندین گونه باکتری اسید لاکتیک، جایگاه دی-آلانین با استفاده از دی-لاکتات یا دی-سرین در مورامیل پنتا پپتید جایگزین شده و بدین ترتیب مانع از اتصال ونکومایسین می‌شود (Sharma *et al*, 2016).

جدول۲- مقاومت جدایه لاکتیکی مورد مطالعه نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم بر اساس آزمون انتشار در دیسک

آنتی‌بیوتیک (میکروگرم ماده موثر)	حساسیت	هاله عدم رشد (میلی‌متر)
استرپتومایسین (۱۰)	مقاوم	۰ h
نالیدیکسیک اسید (۳۰)	مقاوم	۰ h
سیپروفلوکساسین (۵)	مقاوم	۰ h
ونکومایسین (۳۰)	مقاوم	۱۰/۳۷± ۰/۱۰ g
پنی‌سیلین (۱۰)	حساس	۲۱/۵۸± ۰/۲۸ c
آمپی‌سیلین (۱۰)	حساسیت نسبی	۱۸/۷۲± ۰/۹۳ d
ایمیپنم (۱۰)	حساس	۱۶/۶۷ ±۰/۱۸ e
سفازولین (۳۰)	حساسیت نسبی	۲۳/۱۱± ۰/۹۰ b
سفتریاکسون (۳۰)	مقاوم	۱۲/۴۳± ۰/۷۵ f
سفالوتین (۳۰)	حساس	۲۴/۵۱± ۰/۹۳ a

حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

قابلیت همولیز خون

جدایه لاکتیکی مورد مطالعه در این پژوهش، فاقد فعالیت همولیزی بود. در مطالعه Abushelaibi و همکاران (۲۰۱۷)، از بین ده سویه مورد مطالعه، یک مورد از نوع آلفا، دو مورد بتا و هفت مورد فاقد فعالیت همولیتیک (گاما) بودند. همچنین در مطالعه Ogunsakin و همکاران (۲۰۱۷)، بر روی چهار باکتری جدا شده از خمیرترش سورگوم، سه مورد همولیز منفی و یک مورد مثبت بود. به‌طور کلی میکروارگانیسم‌ها دارای سه نوع فعالیت همولیزی شامل آلفا، بتا و گاما بوده و هاله‌های ایجاد شده به ترتیب دارای رنگ سبز، زرد کمرنگ و بی‌رنگ هستند. آلفا و بتا همولیز معمولا مربوط به باکتری‌های بیماری‌زا است زیرا این میکروارگانیسم‌ها آنزیم‌هایی نظیر کوآگولاز تولید می‌کنند که توانایی تجزیه گلبول‌های قرمز را دارند.

اثر ضدقارچی جدایه لاکتیکی

در شکل ۲ اثر ضدقارچی *E. hirae* بر روی *A. niger* پس از گذشت چهار روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل (فاقد جدایه لاکتیکی و حاوی اسپور قارچ) نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز، جدایه لاکتیکی موجب کاهش ۴۷/۱۵ درصدی رشد قارچ و همچنین ممانعت از اسپورزایی (تغییر رنگ) آن گردید. بر اساس گزارش Demirbaş و همکاران (۲۰۱۷) در خصوص اثر ضدقارچی ۱۵ باکتری اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش، مشخص شد که *L. plantarum* و *L. paraplantarum* بر *A. niger* و *P. chrysogenum* اثر مهارکنندگی قابل توجهی داشتند. تولید ترکیبات اسیدی می‌تواند موجب مهار رشد میکروبی شود و عمل ضدقارچی اسیدهای آلی (اسید لاکتیک، استیک، فرمیک، پروپیونیک و بوتیریک) نیز با عبور متابولیت‌های تجزیه نشده از غشای لیپیدی سلول و در نهایت از بین رفتن زیست‌پذیری قارچ اتفاق می‌افتد. متابولیت‌های دیگری نظیر دی‌اکسید کربن، اتانول، پراکسید هیدروژن، اسیدهای چرب، دی‌پپتیدهای حلقوی، ۴-هیدروکسی فنیل پروپانوئیک اسید، فنیل پروپانوئیک اسید و فنیل لاکتیک اسید و همچنین ترکیبات شبه باکتریوسینی از طریق اسیدی کردن محیط سلول، مهار گلیکولیز، افزایش یا تغییر نفوذپذیری غشاء قارچ، مهار زنجیره انتقال الکترون، اختلال در فسفریلاسیون، مهار فنیل آلانین دهیدروژناز و مهار سنتز اسپور قارچ، موجب بروز اثر ضدقارچی می‌شوند (Sadeghi *et al*, 2019; Oliveira *et al*, 2015).



شکل ۲- اثر ضدقارچی جدایه لاکتیکی بر *A. niger* بعد از ٤ روز گرمخانه گذاری در مقایسه با نمونه کنترل در آزمون کشت دو لایه

نتیجه‌گیری

در مجموع و بر اساس نتایج پژوهش حاضر، قابلیت‌های پروبیوتیکی و اثر ضدقارچی جدایه *E. hirae* به‌عنوان باکتری اسید لاکتیک غالب جدا شده از خمیرترش کینوا مورد تایید قرار گرفت. روماند فاقد سلول حاصل از کشت این جدایه لاکتیکی نیز از اثرات بازدارنده مناسبی بر روی عوامل باکتریایی غذازاد برخوردار بود که امکان استفاده از آن را در صنایع غذایی و دارویی به‌عنوان یک نگهدارنده زیستی نشان می‌دهد.

قدردانی و تشکر

احتراما بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که بخشی از هزینه‌های اجرای این پژوهش را در قالب یک پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد، تامین نمودند صمیمانه قدردانی می‌گردد.

منابع

Abnous, K., Brooks, S.P., Kwan, J., Matias, F., Green-Johnson, J., Selinger, L.B., Thomas, M., & Kalmokoff, M. 2009. Diets enriched in oat bran or wheat bran temporally and differentially alter the composition of the fecal community of rats. *The Journal of Nutrition*, 139(11), 2024-2031.

Abriouel, H., Muñoz, M.D.C.C., Lerma, L.L., Montoro, B.P., Bockelmann, W., Pichner, R., Kabisch, J., Cho, G.S., Charles Franz, M.A.P.Gálvez, A., & Benomar N. 2015. New insights in antibiotic resistance of Lactobacillus species from fermented foods. *Food Research International*, 78, 465-481.

Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P., & Ayyash, M. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 316-325.

Adisa, A.M., & Ifesan, B.O.T. 2016. Probiotic potential of lactic acid bacteria (lab) isolate from wholegrain millet sourdoughs. Annals. *Food Science and Technology*, 17(2), 458-468.

Angmo, K., Kumari, A., & Bhalla, T.C. 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 428-435.

AOAC. 2005. Official methods of analysis (18 ed). Gaithersburg, MD: AOAC International.

Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Peyer, L.C., Furey, A., Coffey, A., & Arendt, E.K. 2016. Antifungal activities of three different Lactobacillus species and their production of antifungal carboxylic acids in wheat sourdough. *Applied Microbiology and Biotechnolog*y, 100(4), 1701-1711.

Axel, C., Röcker, B., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., & Arendt, E.K. 2015. Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. *Food Microbiolog*y, 47, 36-44.

Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., & Lindgren, S.E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2, 131–136.

Bernardeau, M, Vernoux, J.P, Henri Dubernet, S., & Guegen, M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278–285.

Campana, R., van Hemert, S., & Baffone, W. 2017. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, 9(1), 12.

Casarotti, S.N., Carneiro, B.M., & Penna, A.L.B. 2014. Evaluation of the effect of supplementing fermented milk with quinoa flour on probiotic activity. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6027-6035.

Collado, M.C., Meriluoto, J., & Salminen, S. 2007. *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*, 40(5), 629-636.

Delgado, S., O'sullivan, E., Fitzgerald, G., & Mayo, B. 2007. Subtractive screening for probiotic properties of Lactobacillus species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *Journal of Food Science*, 72(8), M310-M315.

Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A.A., Yilmaz, M.T., & Dertli, E. 2017. Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 361-366.

García-Cayuela, T., Korany, A.M., Bustos, I., de Cadiñanos, L.P.G., Requena, T., Peláez, C., & Martínez-Cuesta, M.C. 2014. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, 57, 44-50.

Han, Q., Kong, B., Chen, Q., Sun, F., & Zhang, H. 2017. *In vitro* comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. *Journal of Functional Foods*, 32, 391-400.

Kunchala, R., Banerjee, R., Mazumdar, S.D., Durgalla, P., Srinivas, V., & Gopalakrishnan, S. 2016. Characterization of potential probiotic bacteria isolated from sorghum and pearl millet of the semi-arid tropics. *African Journal of Biotechnology*, 15(16), 613-621.

Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., & Schnürer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 129-135.

Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., & Plumed-Ferrer, C. 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 275-283.

Matejčeková, Z., Liptáková, D., & Valík, Ľ. 2017. Functional probiotic products based on fermented buckwheat with *Lactobacillus rhamnosus*. *LWT-Food Science and Technology*, 81, 35-41.

Ogunsakin, A.O., Vanajakshi, V., Anu-Appaiah, K.A., Vijayendra, S.V.N., Walde, S.G., Banwo, K., Sanni, A.I., & Prabhasankar, P. (2017). Evaluation of functionally important lactic acid bacteria and yeasts from Nigerian sorghum as starter cultures for gluten-free sourdough preparation. *LWT-Food Science and Technology*, 82, 326-334.

Oliveira, P.M., Brosnan, B., Furey, A., Coffey, A., Zannini, E., & Arendt, E. K. 2015. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part I: strain characterization and identification of antifungal compounds. *Food Control*, 51, 433-443.

Rajoka, M.S.R., Mehwish, H.M., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L., Shao, D., Xu, X., & Shi, J. 2017. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 271-280.

Reller, L.B., Weinstein, M., Jorgensen, J.H., & Ferraro, M.J. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749-1755.

Rizzello, C.G., Lorusso, A., Montemurro, M., & Gobbetti, M. 2016. Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. *Food Microbiology*, 56, 1-13.

Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 234-240.

Ruiz Rodríguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Cocconcelli, P. S., Fontana, C., Saavedra, L., G. Vignolo & Hebert, E. M. 2016. Biodiversity and technological, functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1289-1301.

Russo, P., Arena, M.P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., & Spano, G. 2017. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 48–54.

Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Raeisi, M., & Nematollahi, Z. 2019. Biological control of foodborne pathogens and aflatoxins by selected probiotic LAB isolated from rice bran sourdough. *Biological Control*, 130, 70-79.

Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., & de Vos, W.M. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 204-211.

Sharma, P., Tomar, S.K., Sangwan, V., Goswami, P., & Singh, R. 2016. Antibiotic resistance of Lactobacillus sp. isolated from commercial probiotic preparations. *Journal of Food Safety*, 36(1), 38-51.

Shahrestani, F. F., Ebrahimi, M. T., Bayat, M., Hashemi, J., & Razavilar, V. 2019. Reduction of aflatoxin M1 by three acid-and bile-resistant antifungal probiotics vs. natamycin in milk. *Biomedical Research*, 30(1), 122-126.

Zhang, Y., Zhang, L., Du, M., Yi, H., Guo, C., Tuo, Y., Han, X., Li, J., Zhang, L., & Yang, L. 2011. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiological Research*, 167(1), 27-31.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 4, Oct- Nov 2021, p. 647-657

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۰، ص. ۶۵۷-۶۴۷

Evaluation of probiotic and antifungal properties of predominant LAB isolated from quinoa sourdough

E. Rouhi[1], A. R. Sadeghi[2*], S. M. Jafari[3], M. Abdolhoseini[4], E. Asadpour[5]

Received: 2020.09.26
Accepted: 2020.11.11

Introduction: Evaluation of probiotic and antifungal properties of lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented substrates has great importance in order to provide microbial cultures for fermentation industries. Among the fermented foods, dairy products play the main role as carriers of probiotics. Meanwhile, non-dairy fermented foods have been rarely studied in order to isolation and characterization of their probiotic microorganisms. Sourdough as a mixture of flour and water is a proper fermented ecosystem to isolate probiotic and antifungal LAB. Besides their desired health, probiotics must become active in the consumer's gastrointestinal tract without any adverse effect. These bacteria can be used as starter, adjunct or preservative cultures to produce different fermented foods. Furthermore, antimicrobial metabolites of the LAB have also numerous potential applications as bio-preservatives in food and/or medical technologies.

Materials and methods: In the present study, after continuous back-slopping process, predominant LAB was isolated from fermented quinoa. Then the LAB isolate was identified using PCR amplification of its partial *16S rDNA* gene. Subsequently, probiotic properties of the LAB including its resistance to low pH and bile salt, antibacterial effects, aggregation potentials, antibiotic susceptibility and haemolytic activity were investigated. Antifungal effect of the LAB on *Aspergillus niger* was also determined using overlay bioassay. Finally, the one way analysis of variance (ANOVA) with the least significant difference (LSD) post hock (at $P<0.05$) was used to data analysis.

Results and discussion: Sequencing results of the PCR products led to the identification of *Enterococcus hirae* as predominant LAB isolated from quinoa sourdough. Sourdough fermentation depends on the several technological and environmental factors and therefore, different types of these complex stressful ecosystems have their specific microflora with unique properties. The LAB isolate had proper survival after continuous pH and bile treatments. Resistance to low pH and bile salt is not sufficient to predict the survival of the probiotics in the actual conditions of the gastrointestinal tract. However, these properties are necessary for assessment of viability and activity in this situation. Furthermore, the highest antibacterial activity of the LAB was observed against *Bacillus cereus* among the studied food borne indicator bacteria. The effect of crude cell free supernatant (CFS) obtained from LAB isolate on indicator bacteria was significantly ($P<0.05$) higher than the naturalized CFS. The inhibitory effect of each LAB is different depending on many factors. In addition to the production of antimicrobial metabolites, probiotics affect pathogens through adhesion to binding sites and limitation of their colonization, as well as prevention from their access to the nutrients. Co-aggregation ability of the LAB was also 54.71%, the LAB had no haemolytic activity and it showed proper profile of antibiotic resistance. Aggregation ability generally leads to the binding of the probiotics to the gastrointestinal cells and it inhibits unwanted microorganisms growth. Haemolytic activities have been introduced for *in vitro* safety assessment of probiotics. Resistance to antibiotics is also controlled by specific biochemical mechanisms against each type of antibiotics. Probiotics as live microorganisms have beneficial effects on the host when consumed in sufficient numbers, and these capabilities are necessary for their activities. Antifungal effect of the LAB was also approved on *A. niger*. The bio-preservative activity of the LAB against fungi would be related to the type and amount of their produced inhibitory metabolites and the low pH. This inhibitory hurdle is also a key parameter to control of fungal spoilage in foodstuff. According to the results, predominant LAB isolated from quinoa sourdough had proper probiotic and antifungal properties. These capabilities are pivotal to select probiotic or protective starter cultures for fermentation technologies.

Keywords: Quinoa Sourdough, Predominant LAB Isolate, Back-Slopping Process, Probiotic, Protective Culture.

1, 2 and 3. MSc student, Assistant Professor, Professor, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources.
4- Assistant Professor, Department of Water Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources.
5. Assistant Professor, Department of Food Science & Technology, Baharan University, Gorgan, Iran.
(*Corresponding Author Email: Sadeghi.gau@gmail.com)